

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-192193

(43)Date of publication of application : 03.08.1993

(51)Int.Cl.

C12Q 1/37  
C12N 9/06  
C12Q 1/26  
//(C12N 9/06  
C12R 1:645 )  
(C12N 9/06  
C12R 1:77 )

(21)Application number : 04-202229

(71)Applicant : GENZYME LTD

(22)Date of filing : 29.07.1992

(72)Inventor : STANIFORD JULIE M  
POWER JOHN A  
LOVELADY JOHN A

(30)Priority

Priority number : 91 9116315 Priority date : 29.07.1991 Priority country : GB

## (54) ASSAY OF NONENZYMATIC GLYCOSYLATED PROTEIN

(57)Abstract:

**PURPOSE:** To provide a new method for diagnostically assaying fructosamine s and to obtain a reagent therefor.

**CONSTITUTION:** A new enzyme ketoamine oxidase for recognizing a ketoamine structure existing in fructosamine and catalyzing the oxidation reaction of the structure is isolated from various microorganisms. A fructosamine pretreated with a protease is oxidized with oxygen in the presence of an enzyme and glucosone, a reaction product thereof, or hydrogen peroxide is measured to specifically determine the fructosamine. This assay method has higher accuracy than a conventional method, is readily handled and is suitable for automatization.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 17.10.1996

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3034698

[Date of registration] 18.02.2000

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-192193

(43) 公開日 平成5年(1993)8月3日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/37		6807-4B		
C 1 2 N 9/06	Z	7823-4B		
C 1 2 Q 1/26		6807-4B		
// (C 1 2 N 9/06				
C 1 2 R 1:645)				

審査請求 未請求 請求項の数13(全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平4-202229	(71) 出願人	591256000 ジェンザイム・リミテッド GENZYME LIMITED イギリス、イングランド、シービー9・8 ピーユー、サフォーク、ハイバーヒル、ホ ランズ・ロード37番
(22) 出願日	平成4年(1992)7月29日	(72) 発明者	ジュリー・エム・スタニフォード イギリス、イングランド、エムイー14・5 エスエイチ、ケント、メイドストーン、グ ローブ・グリーン、ハーベスターズ・ウェ イ35番
(31) 優先権主張番号	9 1 1 6 3 1 5	(74) 代理人	弁理士 青山 葆 (外1名)
(32) 優先日	1991年7月29日		
(33) 優先権主張国	イギリス (G B)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非酵素的グリコシル化タンパク質の検定法

(57) 【要約】

【目的】 新規フルクトサミン検定法ならびにその試薬を提供する。

【構成】 フルクトサミン中に存在するケトアミン構造を特異的に認識し、この構造の酸化反応を触媒する新規酵素ケトアミノキシダーゼを種々の微生物から単離した。あらかじめプロテアーゼ処理したフルクトサミンをこの酵素の存在下で酸素酸化し、その生成物であるグルコソンもしくは過酸化水素を測定することによって、特異的にフルクトサミンを定量できることを明らかにした。

【効果】 本検定法は従来法に比べて精度が高く、操作が容易であり、自動化に適している。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 試料をプロテアーゼで処理し、そのプロテアーゼ処理試料をケトアミノキシダーゼで処理し、その反応生成物を測定することを特徴とする、試料中の非酵素的グリコシル化タンパク質の測定法。

【請求項2】 ケトアミノキシダーゼが細菌群クレブシエラまたはコリネバクテリウム、真菌属フサリウムまたはアクレモニウム、あるいは酵母属デブリオマイセスから入手可能である請求項1の測定法。

【請求項3】 ケトアミノキシダーゼがデバリオマイセス・パンリジアエ変種パンリジアエから入手可能である請求項2の測定法。

【請求項4】 プロテアーゼがプロテイナーゼK、プロナーゼE、アナナイン、サーモリシン、ズブチリシンおよびウシ膀胱プロテアーゼ類から選択される請求項1から請求項3までのいずれかの測定法。

【請求項5】 プロテアーゼ処理を界面活性剤の存在下で実施する請求項1から請求項4までのいずれかの測定法。

【請求項6】 界面活性剤がSDS、“Brij 35”または“Tween 20”である請求項5の測定法。

【請求項7】 反応生成物がトリンダー反応を用いて測定される過酸化水素である請求項1から請求項6までの測定法。

【請求項8】 プロテアーゼおよびケトアミノキシダーゼを含有することを特徴とする、試料中の非酵素的グリコシル化タンパク質測定用キット。

【請求項9】 非酵素的グリコシル化タンパク質の糖部分の1位の炭素原子の酸化反応を触媒し、その結果としてアミン結合の加水分解的破壊によるアミノ酸からの糖オゾンおよび過酸化水素の放出をもたらすことを特徴とするケトアミノキシダーゼ。

【請求項10】 細菌群クレブシエラまたはコリネバクテリウム、真菌属フサリウムまたはアクレモニウム、あるいは酵母属デブリオマイセスから入手可能である請求項9のケトアミノキシダーゼ。

【請求項11】 デブリオマイセス・パンリジアエ変種パンリジアエから入手可能である請求項10のケトアミノキシダーゼ。

【請求項12】 モデル基質を誘導物質および/または選択物質として使用することを特徴とする請求項9から請求項11までのいずれかのケトアミノキシダーゼの生産法。

【請求項13】 モデル基質がブチルアミノデオキシフルクトースである請求項12の生産法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は検定法に関し、より具体的には生物学的材料中のフルクトサミン類または他の非酵素的グリコシル化タンパク質(glycated protein: 本

用語はグリケーションを受けたタンパク質を意味する)の測定法に関する。

## 【0002】

【従来の技術とその課題】 フルクトサミン類は、例えば血清などの生物学的材料中に存在する非酵素的グリコシル化タンパク質である。“グリケーション”は、還元糖類(グルコースなど)とタンパク質(血清アルブミンなど)の縮合によるタンパク質の非酵素的なグリコシル化と定義される(Roth, M., (1983), Clin. Chem., 29, 1991を参照のこと)。グルコースのアルブミンとの反応には、グルコース・カルボニル基に対する該タンパク質上の遊離アミノ基の求核攻撃が関与する。これによって生じる Schiff 塩基は加水分解されてグルコースとタンパク質に戻ることもあり、またアマドリ転移(Hodge, J. E., (1955), Adv. Carbohydr. Chem., 10, 169-205を参照のこと)を受けてケトアミン構造を形成することもある。この一連の反応を添付の図1に記載する。アマドリ化合物は溶液状態で、その直鎖状ケトアミン構造の数種の環状ヘミケタール立体配座への平衡によって安定化される。主なグリコシル化部位はリジン残基のε-アミノ基ならびにそのタンパク質の末端アミノ酸のα-アミノ基である。一旦ケトアミン構造が生成すれば、この安定なケトアミン構造はそのタンパク質の寿命の間ずっとそのタンパク質に残存する。

【0003】 多くの疾患状態は、その身体の中間代謝物の特異な成分の異常に高いか、もしくは異常に低いレベルによって特徴づけられる。健康集団におけるある成分の正常な濃度範囲が知られている場合には、この成分の異常レベルの検出が、疾患のもたらす代謝障害の有用な指標を提供する。したがって臨床的診断試験の目的は、血液、尿および髄液などの体液ならびに組織および他の材料についての定性的および定量的な分析の実施を可能にすることである。これらの試験から得られる情報は医師にとって疾患の監視および治療に際して有用である。この情報が有意義であるためには、実施される試験が信頼でき正確でなければならない。一般に診断的検定法はその検定法の根拠として、分析物に特有のなんらかの化学的特性を利用する。測定すべき分析物を含有する体液または他の材料の試料を、一般に適切な処理の後、特定の様式で分析物と相互作用して測定可能な信号をもたらすように設計された試薬と接触させる。したがって、化学的検定法には分析物と測定可能な様式で反応し、その試料中の他の成分とは反応しない試薬が含まれるであろう。試薬と分析物との反応は、理想的には、他の物質が同じ様式では反応しない程度に特異的でなければならない。しかしこれは化学薬品に基づく検定法では稀なことであり、妨害的な副反応がしばしば問題になる。

【0004】 この問題は、酵素に基づく検定法を設計することによってしばしば克服され得る。酵素はまさにその本質ゆえに、その基質分子に対して高度に特異的であ



る。特異的な反応を行うために酵素はその基質の化学的特性に依存するが、酵素はまず、結合が起こり得るように基質の物理的および化学的“形状”を認識しなければならない。そうして初めて酵素反応が起こる。したがって酵素に基づく検定法では、通常、分析物に対して特異的な酵素を含有する試薬を用いることによって分析物を結合し、測定可能な様式で分析物を変換する。したがって酵素に基づく診断的検定法は化学薬品法と比較して特異性という利点を提供し得る。

【0005】血中に存在するフルクトサミンのレベルは、血清中に溶解しているグルコースなどの糖類の濃度によって決定される。フルクトサミン類は血清中で2〜3週間の半減期を持つので、フルクトサミンの存在レベルは1〜3週間の期間にわたる平均血液グルコースレベルを反映する。したがって、このパラメーターの測定は真性糖尿病における血糖制御を監視する有用な手段である。

【0006】現在、血清フルクトサミン類のレベルを測定するために数種の方法が確立されている。例えばある方法は、アフィニティークロマトグラフィーによって非酵素的グリコシル化タンパク質をグリケーションされていないタンパク質(unglycated protein)から分離する操作を伴う(Diabetes, (1980), 29, 1044-1047を参照のこと)。

【0007】固定化m-アミノフェニル-ホウ酸は、アルカリ性条件下でグリケーション化糖類(glycating sugars)のシス-ジオール基と錯化する。未結合の物質を緩衝液を用いる洗浄によって除去し、フルクトサミン類を高濃度のソルビトールで溶出させる。次いで、溶出液中のフルクトサミンのレベルを280nmにおける吸光度か、もしくは化学的方法によって測定することができる。このような方法の欠点は、遊離のグルコースをまず試料から除去しなければならないこと、ならびに固定化m-アミノフェニル-ホウ酸に結合する非酵素的グリコシル化タンパク質の量がクロマトグラフィー条件に決定的に依存するという点である。したがってこれはこの方法の精度を減少させるであろう。

【0008】もう1つの既知の方法はケトアミン結合の酸加水分解反応の分解生成物の検出を伴う。非酵素的グリコシル化タンパク質を高温下強酸(例えば6mol/l HCl, 95℃)で処理すると非酵素的グリコシル化リジン残基(グリケーションを受けたリジン残基)の加水分解が起こり、特異的生成物：N-(2-フロイルメチル)-L-リジン[フロシン]が得られる。逆相カラムと254および280nmの同時UV検出を用いるHPLCでフロシンを測定する(J. Clin. Chem. Clin. Biochem., (1981), 19, 81-87を参照のこと)。既知量の非酵素的グリコシル化リジン残基を含有するヒト血清アルブミンを校正に用いる。しかしこの方法には時間がかかり、日常的な操作あるいは自動化には適さない。

【0009】フルクトサミンの酸加水分解反応は、弱酸もしくは希酸での処理によって5-ヒドロキシメチル-2-フルフルアルデヒドを得る別の方法でも用いられている。HPLC分離の後、この生成物を280nmでの分光光度測定法で測定することができる。しかし、より便利な方法はこのフルフルアル生成物と2-チオバルビツール酸との反応を含み、この反応により443nmに最大吸光度を有する誘導体が得られる(FEBS Lett., (1976), 71, 356-360を参照のこと)。この方法は専用の装置を用いて部分的に自動化されている。しかしその結果の精度は、試料中のタンパク質レベル、酸加水分解反応の条件およびグルコースの除去を含むいくつかの要素に依存する。

【0010】最近上記の方法の多くに代わって用いられるようになった別法は、アルカリ性溶液中のフルクトサミンの還元能に依存している。このような方法の1つは、ニトロブルー・テトラゾリウム(NBT)を含有する炭酸塩緩衝液(pH 10.35)への血清試料の添加を伴う。NBTがおそらくスーパーオキシドラジカル中間体を經由して還元され、そのホルマゼン生成物の吸光度を550nmで測定する。この方法は血清中のほとんどの妨害成分が最初の10分間に反応するという観測に頼っており、それゆえに特異的な血清還元活性を10分と15分の間に測定する。この方法は迅速であり、臨床的な診断に用いるために種々の分析機で自動化されている。しかし非酵素的グリコシル化タンパク質に関するこの方法の特異性は疑問視されており、非特異的成分が結果の干渉および誤解を招き得ることが示されている。さらにフルクトサミンレベルはその試料中のアルブミンのレベルによる影響を受けるので、とりわけ低アルブミン血症の場合に、結果を調節する必要がある。

【0011】本発明の目的は、例えば糖尿病制御の指標として血清フルクトサミン・レベルを測定する方法であって、現行の方法よりかなり有利な方法を提供することにある。これを実行するためには、非酵素的グリコシル化タンパク質を基質として使用し得る酵素を提供する必要があった。

【0012】

【課題を解決するための手段】本発明は、試料中の非酵素的グリコシル化タンパク質の測定法であって、その試料をプロテアーゼで処理し、プロテアーゼ処理したタンパク質をケトアミンオキシダーゼで処理し、この反応の生成物を測定することからなることを特徴とする方法を提供する。(このケトアミンオキシダーゼ類の特徴は、その反応によって糖オゾンおよび過酸化水素が生成し、そのどちらかを試料中の非酵素的グリコシル化タンパク質含量の指標として従来の手段で測定できるということである。)

【0013】ケトアミンオキシダーゼが細菌群クレブシエラまたはコリネバクテリウム、真菌属フサリウムまたはアクレモニウム、あるいは酵母属デバリオマイセスか

5

ら入手可能なものであることが好ましく、ケトアミノオキシダーゼがデバリオマイセス・パンリジアエ変種パンリジアエ(*Debaryomyces vanriijiae* var. *vanriijiae*)から入手可能なものであることがより好ましい。一般的には、プロテイナーゼK、プロナーゼE、アナナイン(*anain*)、サーモリシン、ズブシリシンおよび牛脾臓プロテアーゼ類から選択されるプロテアーゼを用いて、プロテアーゼ予備処理を行う。このプロテアーゼ処理を適切な界面活性剤、具体的にはSDS、“ブリッグ(Brig) 35”および“トウィーン20”、の存在下で行うことが好ましい。通常は、含まれている過酸化水素を測定する方がオソンを測定するより便利であり、これは既知のトリンダー(Trinder)法によって容易に行うことができる。

【0014】さらに本発明は、試料中の非酵素的グリコシル化タンパク質の測定用キットであって、プロテアーゼおよびケトアミノオキシダーゼを含有することを特徴とするキットをも提供する。

【0015】また本発明は、非酵素的グリコシル化タンパク質の糖部分の1位の炭素原子の酸化を触媒し、その結果としてアミン結合の加水分解的破壊によるアミノ酸からの糖オソンおよび過酸化水素の放出をもたらすことを特徴とするケトアミノオキシダーゼ、ならびにその生産法であって、モデル基質、好ましくはブチルアミノデオキシフルクトース(BADF)を誘導物質および/または選択手段として使用することからなる方法をも提供する。このような酵素の好ましい供給源は上述の通りである。

【0016】本発明はアマドリ型のケトアミン化合物に対して特異的なこのような酵素の使用を包含する。酵素に基づく本発明の方法はこのような化合物に対して高度な特異性を有する。本発明のさらなる利点は、使用する酵素がその反応の副生成物として $H_2O_2$ を放出するオキシダーゼであることにある。放出された $H_2O_2$ は容易に、好ましくは広く用いられているトリンダー法(Ann. C lin. Biochem., (1969), 6, 24-27を参照のこと)によって測定でき、したがって現存の自動分析機で容易に自動化され得るフルクトサミン類の測定法を提供する。

【0017】望ましい酵素活性の選択は充分に確立されている微生物学的技術に基づいた。選択技術は規定培養培地の使用に依存し、この培地に何らかの必須原子(例えば窒素など)の単一供給源を指定された標的分子もしくは分析物として補足する。次に、この最小培養培地にある範囲の環境試料を接種する。これらの試料中に存在するであろう多くの微生物のうち、標的分析物を分解するに適した酵素を生産できるものだけが制限的栄養素を解離させて成長することができるであろう。次に、この培地で生育する微生物を単離し、必要な酵素活性を抽出することができる。

【0018】この方法は単純な標的分子あるいは低分子量の標的分子での使用に特に適している。しかし標的分子

6

子がフルクトサミンのように大きく複雑である場合には、この方法の信頼性はかなり低くなる。これは、大きい標的分子中には種々の手段で放出され得る複数の制限的原子が存在し得るからである。例えば、フルクトサミンを選択培地中で成長のための単一窒素源として用いた場合、多くの微生物がタンパク加水分解酵素を用いてこの分子から窒素を抽出する能力を有するであろう。フルクトサミン中の窒素分子の豊富さゆえに、成長をこのタンパク質のケトアミン部分の窒素に依存させるような選択圧は培地中の生物に加わらない。したがって、この分析物は選択培養培地中での使用には不適當である。

【0019】したがってこれらの制限ゆえに、選択培地の設計には異なる方法を用いた。本当の分析物であるフルクトサミンに特有のケトアミン結合に極めて類似しているが、そのケトアミン結合自体の中の窒素原子以外には窒素原子を含有しないモデル標的分子を設計した。培養培地中のこれらの分子からその窒素を遊離させるためには、適切な酵素がなんらかの様式でケトアミン結合を切断する必要がある。したがって、この培地で成長したあらゆる生物は、その代謝構成の一部として、ケトアミン基を基質として使用できる酵素または酵素群を持っているはずである。一度単離すれば、より大きなフルクトサミン分子に対する作用能についてこれらの酵素をスクリーニングすることができる。

【0020】上述のように、フルクトサミン類のケトアミン結合にはグルコースとアミノ酸リジンが関与している。この分析物の最も単純なモデル化合物は非酵素的グリコシル化リジン、即ちフルクトシルリジンであろう。しかしリジンは2つの窒素含有アミノ基を有しているので、フルクトシルリジンは選択培地中の単一窒素源としてはフルクトサミンと類似の欠点を持つであろう。つまり、必ずしも標的ケトアミン結合が破壊されなくても、窒素がこの分子から放出され得るのである。そこで、これに緊密に関連し、窒素原子を1つしか有さない分子フルクトシルバリン(添付の図2を参照のこと)をモデル基質として調製した。フルクトシルバリンを既知の方法で調製した(Keilら, Acta. Chem. Scand., (1985), B39, 191-193)。このモデル・ケトアミン化合物を、ケトアミン代謝活性に関する環境選択における窒素源として使用した。この方法を用いて、フルクトシルバリンを分解し得るいくつかの微生物を単離した。

【0021】フルクトシルバリン中のアミノ酸のサイズが小さいことの欠点は、このアミノ酸の遊離カルボキシル基が糖とアミノ酸の間のケトアミン結合に極めて接近していることである。このカルボキシル基質はフルクトシルバリン・ケトアミン結合における酸-塩基触媒反応を促進することによってケトアミン結合の切断を容易にし得る。これは標的であるフルクトサミン中では起こらないことであるから、ケトアミン結合に反応性基が接近しない第2のモデル基質を設計した。この第2のモデル



であるBADFも既知の方法で調製した(MicheelおよびHogemann, Chem. Ber., (1960), 93, 238)。このモデル基質を添付の図2に記載する。BADFを最小培地中の単一窒素源として用いることによってさらに微生物選択を行い、ケトアミン結合を酸化し得るいくつかの単離物を発見した。異なる特徴を有する目的のケトアミノキシダーゼ酵素のいくつかを、上記の選択によって得た微生物単離物から抽出した。

【0022】これらの新規ケトアミノキシダーゼが触媒する反応を添付の図3に示す。このような酵素は糖部分の1位の炭素原子の酸化を触媒し、その結果としてアミン結合の加水分解的破壊が起こることにより、そのアミノ酸から糖オゾンが放出される。この酸化反応では酸素が電子受容体として作用し、過酸化水素が副生成物として生成する。

【0023】本発明のケトアミノキシダーゼ酵素の好ましい供給源は、細菌群クレブシエラまたはコリネバクテリウム、真菌属フサリウムまたはアクレモニウム、および酵母属デバリオマイセスである。デバリオマイセス・パンリジア変種パンリジアエから得られるこのようなケトアミノキシダーゼを用いた場合、本発明に従って特に良い結果を得ることができる。

【0024】デバリオマイセス・パンリジア変種パンリジアエは一段階麦芽エキスポス培地中で培養できる。ケトアミノキシダーゼの生産は、フルクトシルバリンまたはBADFなどのケトアミンモデル化合物を誘導物質として培地中に含有させることにより特に促進される。この生物は例えば5~9のpH範囲で15~40℃で培養することができる。生育にとって好ましい条件は一般に22~28℃およびpH6.0~8.0である。この生物の生育および該酵素の生産には一般に1~6日を要する。

【0025】あるいは、このような酵素の生産は2段階工程でも起きる。高バイオマスを得るために、生物をトリプトン-大豆培地などの栄養豊富な培地に接種することができる。最大バイオマスに達したら(一般に1~3日間)、細胞を遠心分離によって収集し、誘導物質としてある量のケトアミンモデル化合物を含有する最小塩類培地に入れることができる。誘導させるためにこの培地中で細胞をインキュベートすることができ、この工程には2~24時間を要するであろう。

【0026】現在好ましい1態様として、非酵素的グリコシル化タンパク質を検出するための本発明の方法は、血清中のフルクトサミンなどの検定すべき非酵素的グリコシル化タンパク質試料をプロテアーゼ類(例: プロテイナーゼK、プロナーゼE、アナナイン、サーモリシン、ズブシリシンおよびウシ膵臓プロテアーゼ類)を含有するタンパク加水分解試薬で予備処理することを含む。この予備消化は、ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)、“Brij 35”または“Tween 20”などの界面活性

剤の存在下で実行し得る。次いで、予備処理した試料を細菌群クレブシエラまたはコリネバクテリウム、真菌属フサリウムまたはアクレモニウム、あるいは酵母属デバリオマイセスから選択されるケトアミノキシダーゼ調製物と接触させることができる。

【0027】この方法によってフルクトサミン中の非酵素的グリコシル化リジン基がそのタンパク質から放出され、次いで、この分子がグルコソンの放出を伴って切断され得る。ケトアミノキシダーゼによる非酵素的グリコシル化アミノ酸酸化の特徴は、この酵素による過酸化水素の化学量論的生成である。このように生成した過酸化水素を酵素的に測定することができる。1つの選択枝は、ケトアミノキシダーゼの調製物に、あらかじめ決定した量の西洋ワサビペルオキシダーゼおよびこの酵素に適した色素原基質群(例えば4-アミノフェナゾンおよびN-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジン(TOOS))を含有させることである。この場合には、ペルオキシダーゼによる色素原基質群の酸化に、ケトアミノキシダーゼの作用によって生成した過酸化水素が用いられる。

【0028】この反応はその検定混合物中に発色をもたらす、適切な波長で検定混合物の吸光度の変化を測定することによってこれを検出することができる。したがって、変換された非酵素的グリコシル化タンパク質の量を化学量論的な同値で計算することができる。ジフェニルアミンなどのアルドース試薬を用いてグルコソンを決定することもできる。

【0029】本発明は、2つの試薬または試薬群からなる、非酵素的グリコシル化タンパク質またはフルクトサミンを測定するための診断用キットを提供する。1つの試薬群は、1または複数のプロテアーゼ、および試料の予備処理で使用する界面活性剤を含有する。他方の試薬群は、予備処理中に生成した非酵素的グリコシル化アミノ酸を酸化する本発明のケトアミノキシダーゼ、ならびにトリンダー試薬類(例: ペルオキシダーゼ、色信号を形成させるために使用するフェノール性またはアニリン性共役剤および4-アミノフェナゾン)を含む検定成分を含有する。典型的には、検定すべき試料の一部を適切な体積の検定試薬に加える。この検定混合物を10~60℃、より好ましくは30~50℃の温度で、5~9.5、より好ましくは6~8のpHで適切な時間、通常は2~20分間インキュベートすることができる。酸化速度を速度法または終点法で測定することができる。

【0030】本発明は新しいフルクトサミン検定法を提供する。この方法はフルクトサミン中に存在する型のケトアミン結合に対して特異的な新しい酵素に基づくので、現行のフルクトサミン検定法より優れている。この特異性ゆえに、本発明の検定法は一般に、おそらく血液試料中に存在する他の物質によるのであろう妨害に対して現行の方法より感受性が低い。本法を現存する自動分

析機での使用に適合させることは容易であろう。

【0031】以下の実施例によって本発明がより明確になるであろう。

【0032】

【実施例】

#### 実施例1

フサリウム・オキシスポラム(IMI353456)を、次に示す成分からなる培地 100mlを含有する500mlエルレンマイヤーフラスコに接種した[培地組成; グリセロール(10g/l)、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (14g/l)、 $\text{KCl}$ (0.5g/l)、 $\text{MgSO}_4$ (0.5g/l)、 $\text{CaCl}_2$ (0.02g/l)およびフルクトシルバリン(2g/l)]。この振盪フラスコ培養を楕円浸透機上30℃で4日間インキュベートした。この期間の後、3500rpm15分間の遠心分離によって細胞を収集した。この細胞を0.1Mリン酸緩衝液(pH8.0)で洗浄し、前と同様に再度遠心分離した。次に、得られた細胞ペレットを0.1Mリン酸緩衝液(pH8.0)に懸濁することによって、その体積を最初の収集体積の20%とした。目的の酵素はこの生物の細胞内に存在するので、この細胞懸濁液の各20mlをそれぞれ15分間超音波処理することにより、この酵素を溶液中に放出させた。次に超音波処理物を3500rpmで30分間遠心分離することにより、細胞デブリス(残骸)を除去した。得られた酵素溶液を0.1Mリン酸緩衝液(pH8.0)31(2回交換)に対して4℃で20時間透析した。

【0033】この調製物の活性をモデル基質BADFを用いて検定した。検定混合物を以下のように調製した：

200μl 酵素調製物

40μl 西洋ワサビペルオキシダーゼ(1.45mg/ml)

60μl フェノール(5.5mg/ml)

60μl 4-アミノフェナゾン(2mg/ml)

420μl 0.1Mリン酸緩衝液(pH7.9)。

【0034】この混合物を1mlキューベット中37℃で予備インキュベートし、吸光度の変化を505nmで追跡することによって対照速度(対照系の速度)を測定した。次に120μlのBADF(3mg/ml)をこのキューベットに加え、ケトアミノキシダーゼ活性を測定した。(活性1単位を、37℃で1分間に1μmolのBADFの酸化をもたらす酵素量と定義する。)この方法によって、この調製物のケトアミノキシダーゼ活性が30U/lであることがわかった。

#### 【0035】実施例2

トリプトン-大豆培地 50mlを含有する250ml振盪フラスコにアクレモニウム種(IMI353437)の培養から得た細胞を接種した。この振盪フラスコを楕円浸透機上30℃で24時間インキュベートした。次にこの培養の15mlを滅菌トリプトン-大豆培地 1.5lを含有する2l攪拌発酵器に無菌条件下で接種した。この発酵器に滅菌フィルターを通してBADF溶液 350mg/l

を加えた。この培地を1000rpmで攪拌し、培養を通して1l/分の空気を散布した。発酵の間、温度を28℃に維持した。

【0036】96時間後、培養プロセスの470nmでの吸光度が1.2~1.5光学密度単位に達し、発酵器の内容物を7000rpm15分間の遠心分離により収集した。得られた細胞ペレットを0.1Mリン酸緩衝液(pH8.0)で洗浄した後、同緩衝液 250mlに再懸濁した。25分間の超音波処理によって細胞を溶解し、細胞デブリスを7000rpm20分間の遠心分離によって除去した。その上清酵素溶液を上記のリン酸緩衝液(5l x 2)に対して透析した。実施例1に記述した検定法を用いることによって、この調製物が10U/lのケトアミノキシダーゼを含有することがわかった。

#### 【0037】実施例3

麦芽エキスポス 50mlを含有する250ml振盪フラスコにデカリオマイセス・パンリジア変種パンリジアエ(NCYC2386)の培養から得た細胞を接種した。この振盪フラスコを滅菌麦芽エキスポス 1.5lの入った攪拌発酵器に滅菌条件下で接種した。誘導物質としてBADF 0.5g/lをこの発酵器に滅菌フィルターを通して加えた。この培地を1000rpmで攪拌し、培養を通して1l/分の空気を散布した。この発酵の間、温度を28℃に維持し、pHを6.0に制御した。

【0038】24時間後、遠心分離によって細胞を収集し、50mMリン酸緩衝液(pH7.5)でその細胞を洗浄し、次いで遠心分離することによって再度集めた。その細胞ペレットを体積が250mlになるように同緩衝液に再懸濁し、そのスラリー(泥状物)を超音波処理することにより細胞を溶解した。

【0039】凝集剤“マグナフロク(Magnafloc)LT31”(0.1%)をこの懸濁液に加え、細胞デブリスを遠心分離によって除去した。固形硫酸アンモニウムを40%飽和になるように添加することによって、この溶液の硫酸アンモニウム前方分画を行った。これによって生成した沈澱を遠心分離で除去して捨てた。硫酸アンモニウム濃度を65%飽和に上げることによって後方分画を行い、その沈澱を回収した。この沈澱を20mMピペラジン緩衝液(pH5.5)50mlに再懸濁し、この溶液をアミコンセントリプレップ30モジュールで、0.1mM EDTA、0.1mM PMSFおよび0.2mM ペンズアミジンを含む同緩衝液に対してダイアフィルトレーションした。ダイアフィルトレーションの後、この溶液を3000rpmで20分間遠心分離することによって沈澱を除去した。その上清の6mlを、あらかじめ20mMピペラジン(pH5.5)緩衝液で平衡化しておいたファルマシアMono S HR5/5カラムに充填し、非勾配系溶出液15カラム体積によってケトアミノキシダーゼ酵素をこのカラムから溶出させた。ケトアミノキシダーゼを含有する画分を集めることによって、0.8U/ml



ケトアミノキシダーゼおよび83  $\mu\text{g}/\text{ml}$  タンパク質を含有する調製物を得た。

【0040】この方法で調製した酵素の $K_m$ をBADFに関して決定し、80  $\mu\text{M}$ であることがわかった。添付の図4および図5は上記の方法で調製したケトアミノキシダーゼのpH/活性およびpH/安定性の特性図を示している。活性に関する至適pHは7.0~8.5の範囲であり、一方、本酵素は5~7.5の範囲で最も安定である。

#### 【0041】実施例4

150 mM 塩化ナトリウムを含有する50 mM リン酸緩衝液(pH7.4) 80 mlにシグマ・ヒトアルブミン 4gおよびグルコース 5gを溶解した。この混合物を滅菌フラスコ中に滅菌濾過し、37℃で21日間インキュベートした。この期間の後、この溶液を50 mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.9)に対して透析し、次いで3500 rpmで20分間遠心分離することにより沈澱をすべて除去した。次に、ロッシュ・NBT検定法を用いてこの溶液を検定し、この溶液が3880  $\mu\text{mol}/\text{l}$ のフルクトサミンを含有することがわかった。

【0042】この溶液の一部を50 mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.9)で希釈することにより、フルクトサミン濃度が0~1940  $\mu\text{mol}/\text{l}$ の範囲で変化する一連の試料を作成した。各フルクトサミン希釈液について、予備処理インキュベーション混合物を次のように調製した。

190  $\mu\text{l}$  フルクトサミン溶液

20  $\mu\text{l}$  ジェンザイム・プロテイナーゼK(6 mg/ml)

20  $\mu\text{l}$  シグマ・プロナーゼE(6 mg/ml)

20  $\mu\text{l}$  SDS(1.25%)

【0043】これらの混合物を55℃で30分間インキュベートした。この期間の後、各予備処理チューブから一部を取り出し、以下に記載する微量滴定プレート検定混合物に加えた：

25  $\mu\text{l}$  消化試料

20  $\mu\text{l}$  4-アミノフェナゾン溶液(2 mg/l)

20  $\mu\text{l}$  TOOS溶液(15.5 mg/ml)

10  $\mu\text{l}$  シグマ・西洋ワサビペルオキシダーゼ(1.45 mg/ml)

150  $\mu\text{l}$  50 mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.9)

【0044】各フルクトサミン濃度について1対の検定を行った。

【0045】この微量検定プレートを37℃でインキュベートし、実施例3に記載したように調製した活性1 U/mlのケトアミノキシダーゼ溶液 25  $\mu\text{l}$ を各検定ウェルに加えた。各ウェルについて、反応の初速度を560 nmの吸光度上昇によって5分間測定した。反応の初速度とフルクトサミン濃度との関係を添付の図6に示す。

#### 【0046】実施例5

上記の微量滴定プレート反応混合物を37℃で20分間インキュベートすることによってこのケトアミノキシダーゼ検定反応を完結させたことを除いて、実施例4に記載した操作を繰り返した。この期間の後、各ウェルの吸光度を560 nmで測定した。この方法で得られる平均吸光度とフルクトサミン濃度との関係を添付の図7に示す。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】 グルコースとタンパク質の反応によってフルクトサミンが生成する過程を表す。

【図2】 本明細書に挙げた2種のモデル標的分子フルクトシルバリンおよびプチルアミノデオキシフルクトースの構造式。

【図3】 ケトアミノキシダーゼが触媒するフルクトシルバリンの酸化反応式。

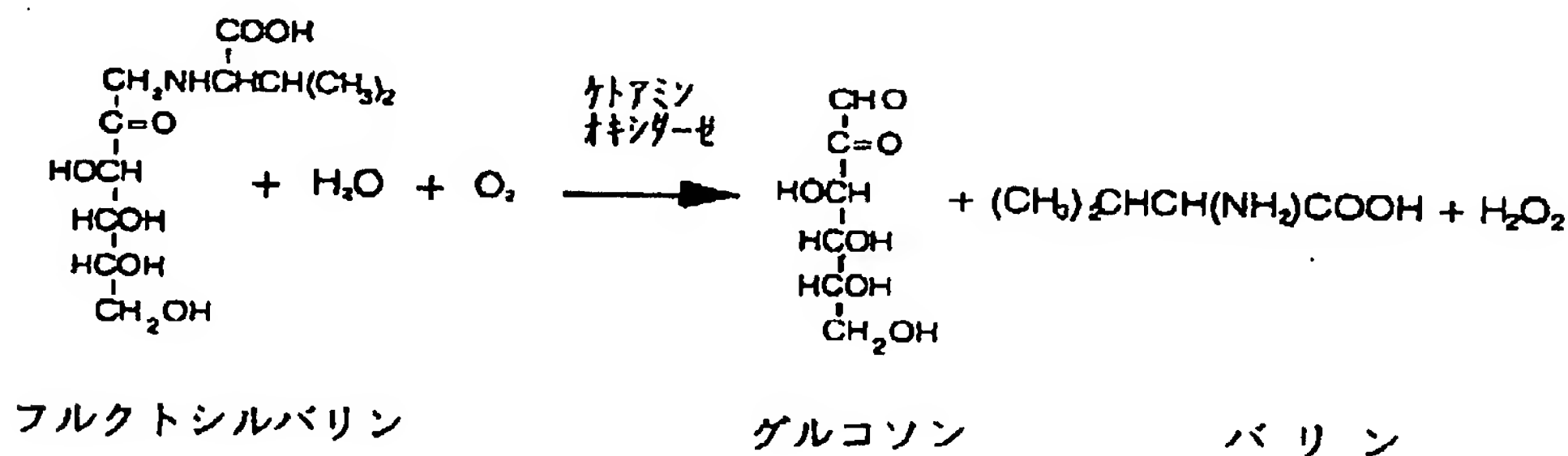
【図4】 ケトアミノキシダーゼの至適pH特性図。

【図5】 ケトアミノキシダーゼのpH安定性特性図。

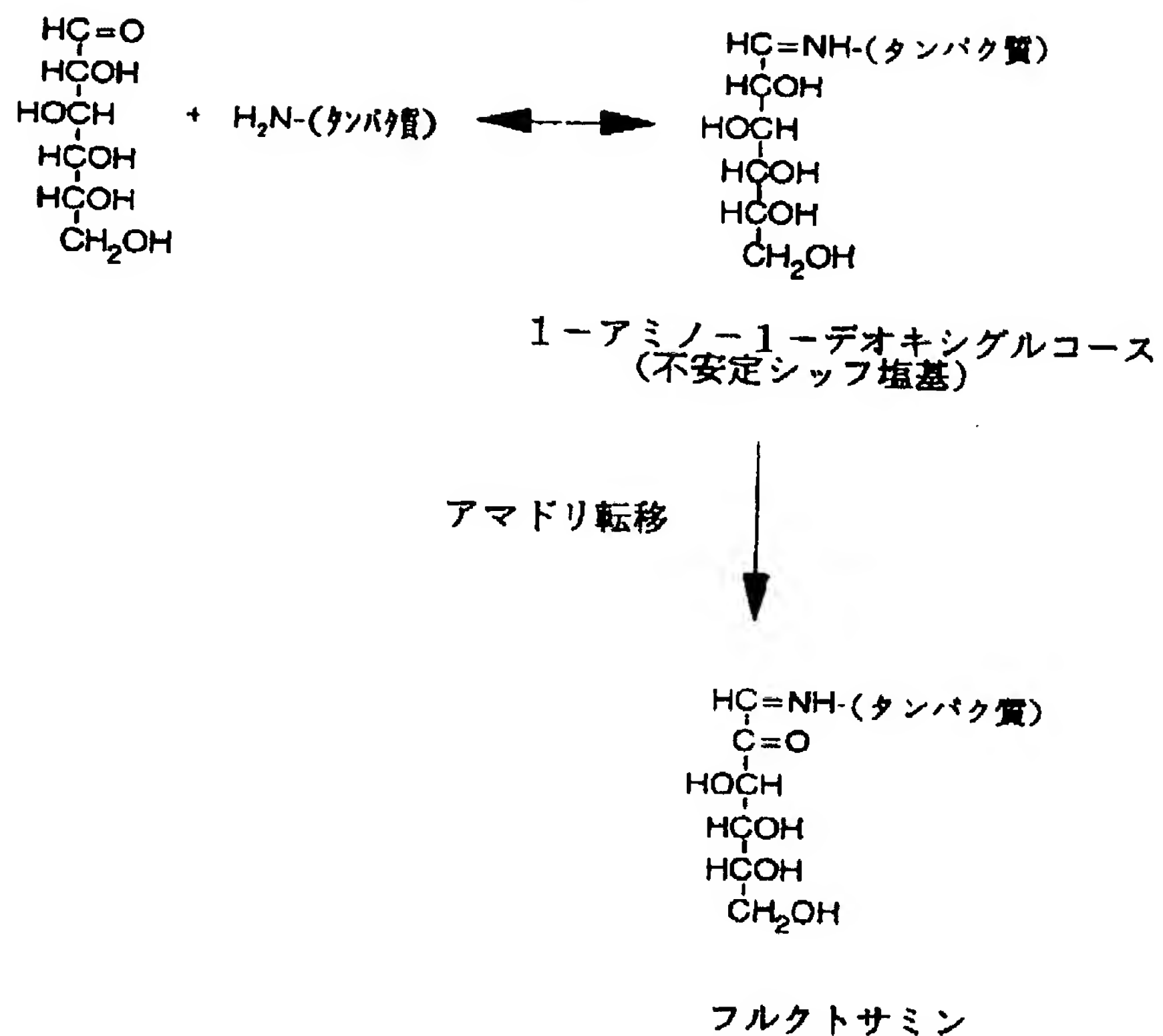
【図6】 速度検定法に関するフルクトサミン標準曲線。

【図7】 終点検定法に関するフルクトサミン標準曲線。

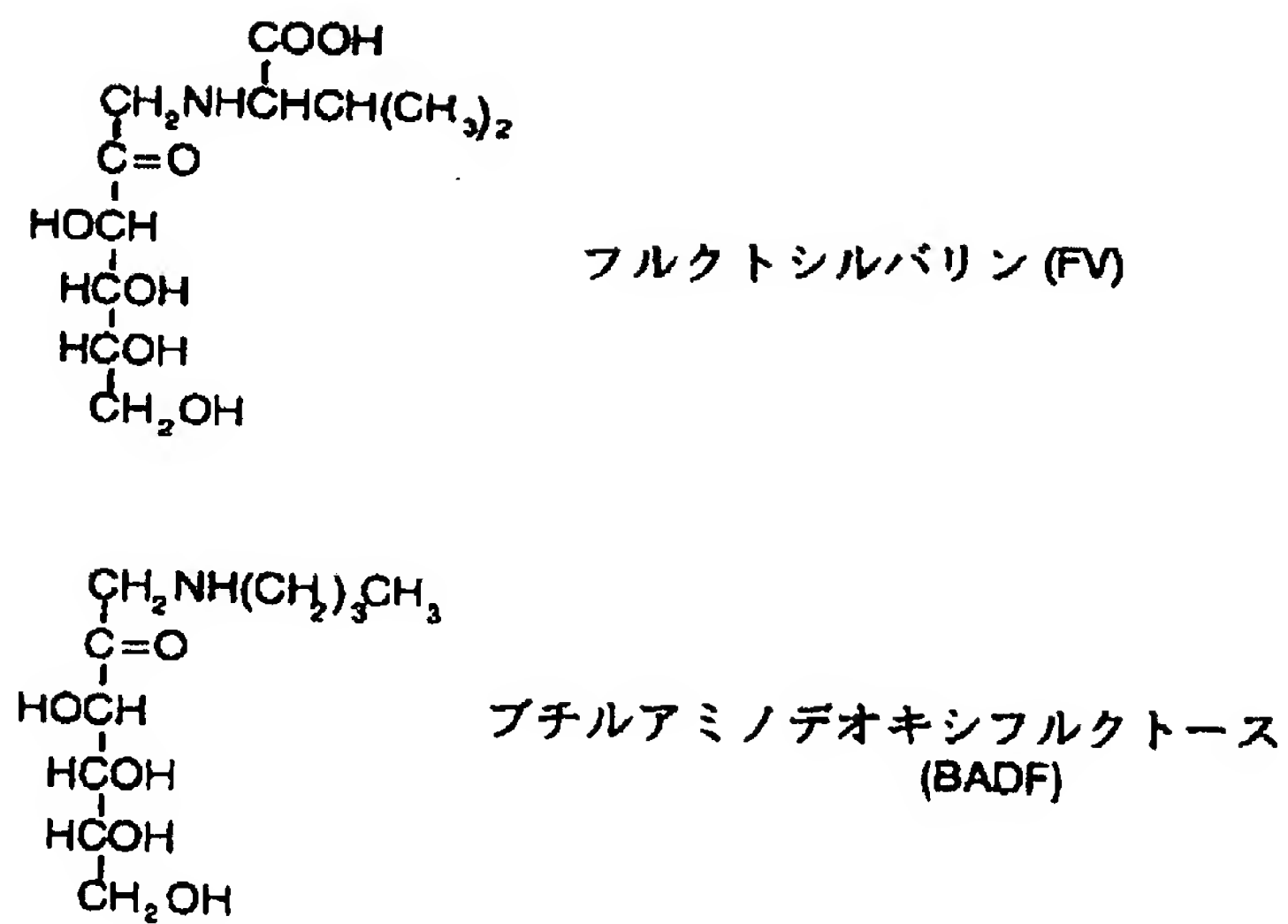
【図3】



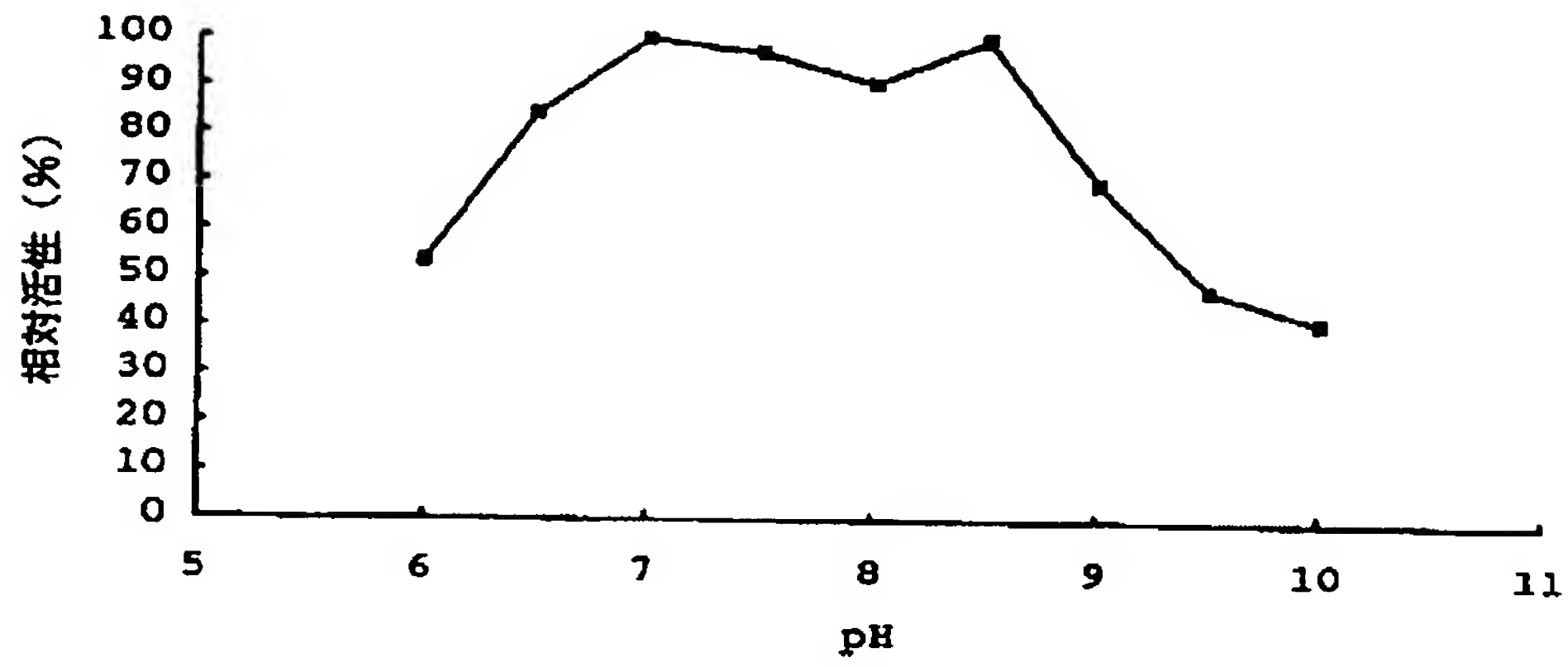
【図1】



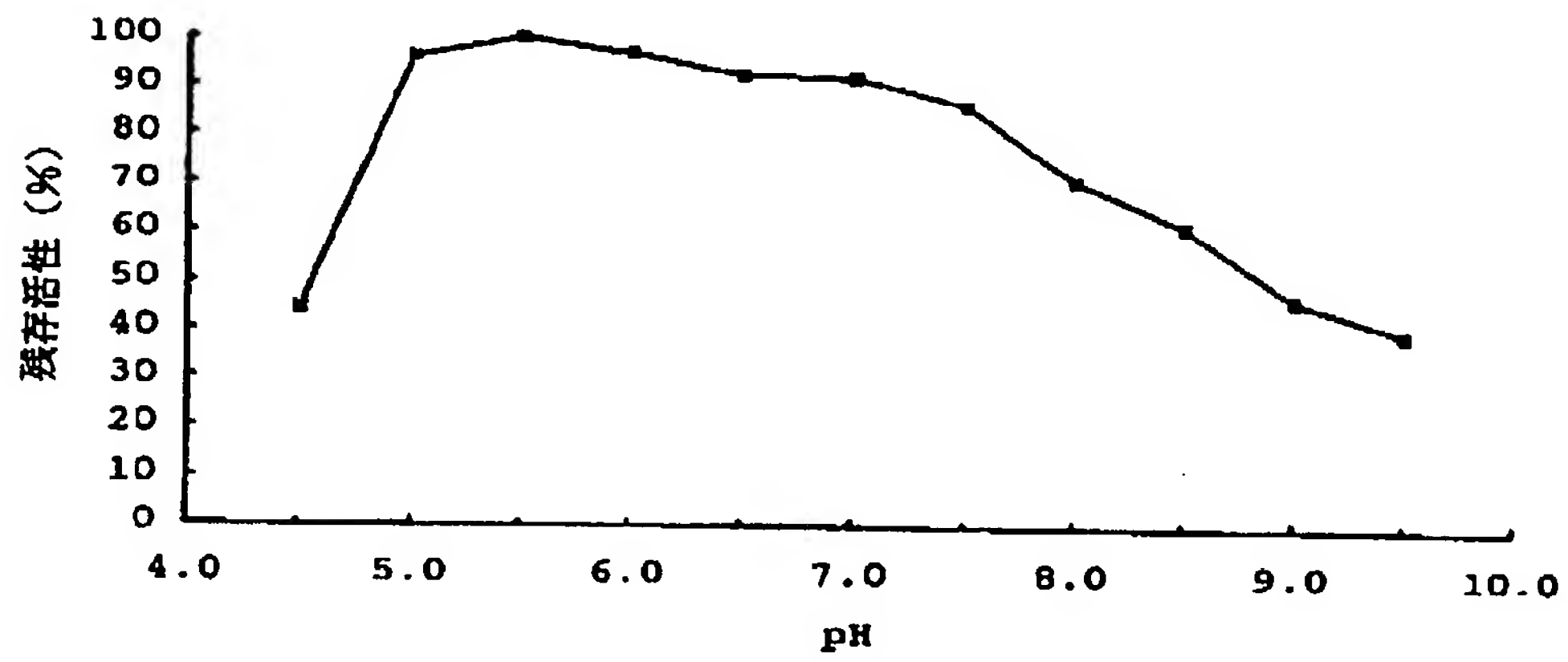
【図2】



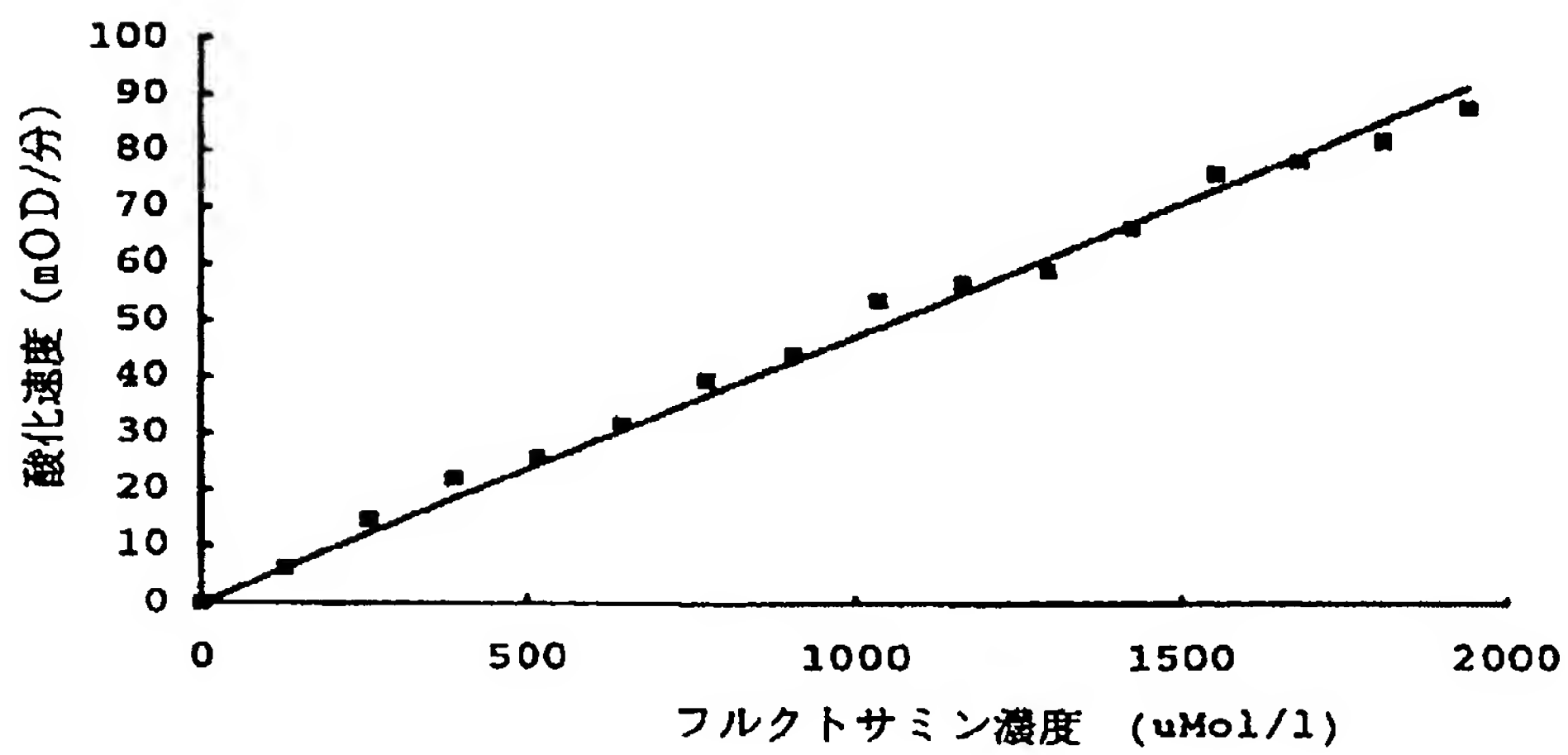
【図4】



【図5】

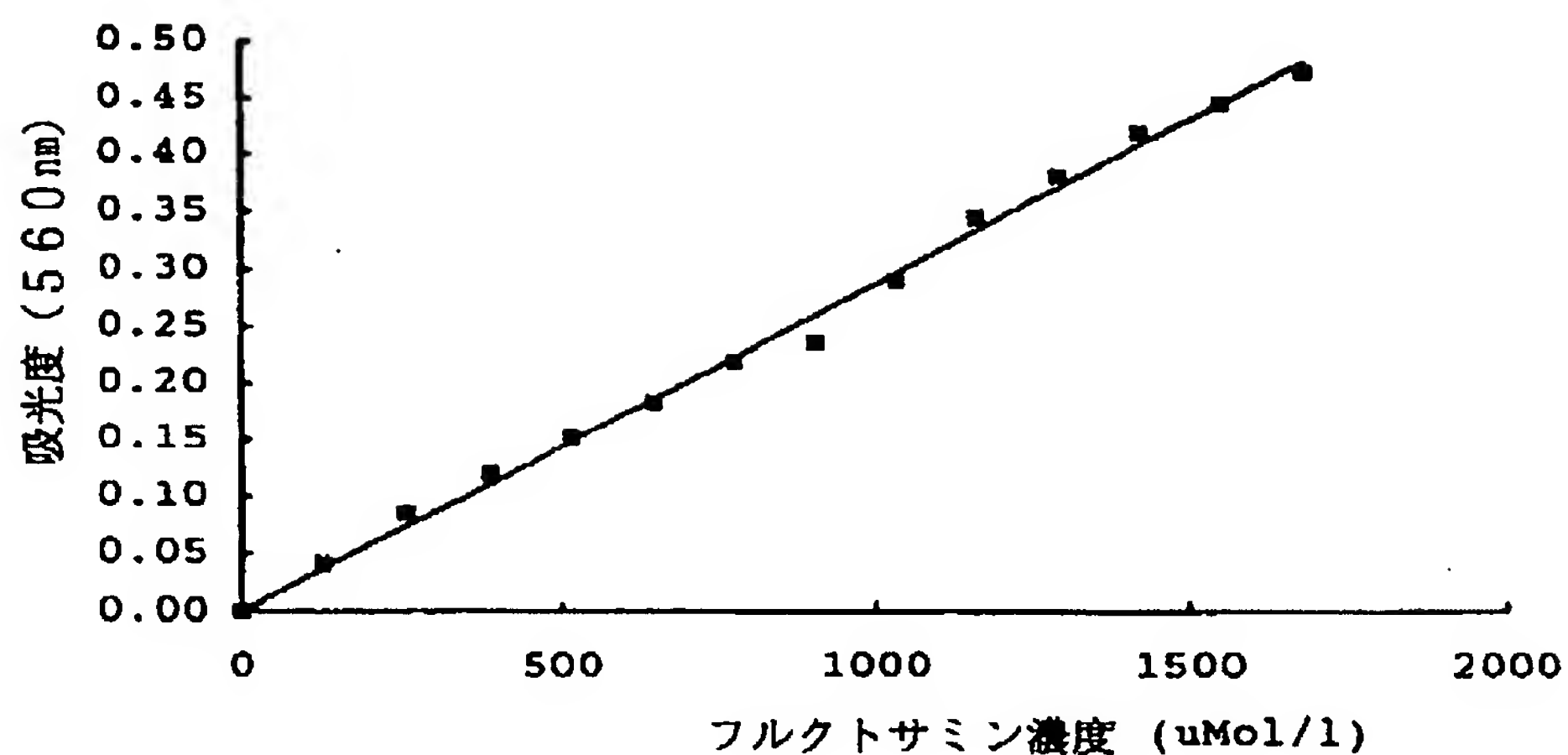


【図6】





【図7】




---

フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(C 1 2 N 9/06

C 1 2 R 1:77)

(72) 発明者 ジョン・エイ・パワー

イギリス、イングランド、ティエヌ15・0  
 デイジー、ケント、セブンオークス、シー  
 ル、チャイルズブリッジ・ウェイ、“アイ  
 ビー・バンク” (番地の表示なし)

(72) 発明者 ジョン・エイ・ラブレディ

イギリス、イングランド、エムイー14・4  
 エイアール、ケント、メイドストーン、ベ  
 アーステッド、ミン・クレセント24番